

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

LA PRÉTENDUE DESTRUCTION DES BAC. DE KOCH DANS LE PÉRITOINE DES COBAYES TUBERCULEUX

par ÉT. BURNET.

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

Lorsqu'on réinocule sous la peau d'un cobaye tuberculeux des bacilles tuberculeux, à condition de prendre une dose de bacilles assez forte et un cobaye dont la maladie ne soit ni trop récente ni trop ancienne, on observe, au lieu des phénomènes bien connus qui suivent une première inoculation, une nécrose rapide, une élimination par escarre et une guérison locale par cicatrice : c'est le phénomène de Koch, d'où est venue la découverte de la tuberculine.

Les expériences de réinoculation de l'organisme tuberculeux ont pris un regain d'intérêt depuis qu'on cherche le mécanisme de l'immunité antituberculeuse avec l'idée qu'elle se ramène au fond au phénomène de Koch.

A l'hypothèse d'une destruction complète des bacilles réinoculés s'opposent des expériences d'après lesquelles les bacilles de réinfection peuvent se conserver vivants et virulents dans les tissus des animaux qui ont acquis la résistance.

Si l'organisme tuberculeux est capable de détruire les bacilles tuberculeux réinoculés, la destruction s'accomplit-elle par cette lente digestion intracellulaire, dont Metchnikoff a

décrit le type classique chez la gerbille ; ou se fait-il une destruction rapide par les humeurs, qui serait une vraie bactériolyse ?

Dans ces derniers temps, ce sont les réinoculations dans le péritoine qui ont été le principal thème d'expériences, et elles ont suscité une sorte de résurrection du phénomène de Pfeiffer en matière de tuberculose. A en croire des travaux récents, des doses considérables de ce bacille tuberculeux dont on ne connaît que trop la nature réfractaire aux moyens d'action de l'organisme, seraient dissoutes, dans l'exsudat péritonéal du cobaye réinoculé, en quelques instants et avec une facilité inconnue des plus fragiles vibrions cholériques. A cette disparition rapide des bacilles flottants dans l'exsudat on oppose la résistance des bacilles englobés par les leucocytes ; et tandis que l'on affirme la toute puissance de l'action humorale, on montre que les phagocytes ont reçu la mission providentielle de préserver les bacilles. « Les bacilles tuberculeux, disent textuellement Arima et Sakamura (1), bien loin d'être détruits dans les leucocytes, semblent au contraire s'y multiplier progressivement, de telle sorte que les fameux phagocytes, au lieu d'être des cellules dévoratrices, sont pour les bacilles un abri contre les substances défensives et bactéricides de l'organisme ; ils peuvent même s'y multiplier. » Moins radicaux, Kraus et Hofer (2) admettent que la phagocytose existe comme la bactériolyse, mais que la phagocytose est le mode dominant chez l'animal neuf, la bactériolyse chez l'animal tuberculeux. « L'immunité bien démontrée de l'organisme tuberculeux vis-à-vis de la réinfection *pourrait s'accorder assez bien* avec l'accroissement du pouvoir bactériolytique. »

Ces derniers mots ne sont pas, on le voit, des plus catégoriques, et la plupart des auteurs font tout au moins des réserves sur cette action bactériolytique. Le problème ayant une grande importance au point de vue du mécanisme de la résistance à la tuberculose, ces expériences méritaient d'être reprises. Selon nous, les faits ont été défigurés au nom des

(1) ARIMA et SAKAMURA, Ueber die Bildung des Bakteriolsins durch T. Bazillen u. deren Gifte. *Centralbl. f. Bakter.*, Orig., t. LXXII, 1913, p. 389.

(2) KRAUS et HOFER, Ueber die Auflösung von Tuberkelbazillen im Peritoneum gesunder und tuberkulöser Meerschweinchen. *Deutsche m. W.*, 1912, n° 26, p. 1227 et *Wiener klin. W.*, 18 juillet 1912, p. 1112.

théories. On n'a jamais pu fournir de cette bactériolyse humorale la démonstration la plus solide et la plus simple, qui consisterait à nous la montrer, comme on montre sous le microscope la réduction en granules des vibrions dans le péritoine du cobaye immunisé. Les expériences destinées à en donner la preuve indirecte ne soutiennent pas la discussion. Ce que l'on trouve dans les faits, c'est d'une part une action toxique qui n'est pas niable (mais personne ne peut avoir aujourd'hui la prétention de réinventer la tuberculine); d'autre part, ces actions cellulaires qui justement ne semblent dans aucune infection aussi évidentes que dans la tuberculose.

Décrivons d'abord les expériences de réinoculation telles que nous les avons observées bien des fois. Nous insisterons ensuite sur les principaux faits au nom desquels on affirme la bactériolyse.

DESCRIPTION DES FAITS

Résorption progressive du liquide chez le cobaye neuf, presque complète en vingt-quatre heures; au contraire, augmentation de volume, au double, au triple et davantage, par exsudation péritonéale, chez les cobayes tuberculeux; mort en 5 à 6 heures, avec syndrome tuberculinique, des cobayes réinoculés à trop forte dose ou déjà trop peu résistants; longue survivance d'un certain nombre de cobayes réinoculés : inutile de décrire longuement ces phénomènes bien connus.

Les cobayes, inoculés, la première fois, de bacilles humains ou bovins, et porteurs de ganglions nets et déjà de lésions viscérales, ne doivent avoir une tuberculose ni trop jeune, ni trop vieille et confinant déjà à la cachexie. On fait les expériences avec diverses souches microbiennes; les bacilles de la première et de la seconde inoculation sont, selon les cas, les mêmes ou différents. On réinocule de 3 à 15 milligrammes de bacilles pesés frais, d'une culture de trois semaines environ, en suspension dans 5-10 cent. cubes d'eau physiologique. L'exsudat est prélevé au moyen de pipettes très fines, comme dans l'expérience de Pfeiffer, après 15, 30, 50, 90 minutes, 2, 3, 4, ... 8 heures, par exemple. A chaque prise on dépose une goutte d'exsudat de cobaye réinoculé et une goutte d'exsudat de cobaye inoculé pour la première fois, sur une même lame, de façon à leur appliquer exactement la même coloration.

Au début, on voit beaucoup de bacilles libres dans un exsudat à peu près dénué d'éléments cellulaires; déjà après une

vingtaine de minutes, les bacilles libres deviennent moins nombreux, le liquide se peuple de lymphocytes et devient plus riche en albumine. A la fin de la 1^{re} heure apparaissent les premiers polynucléaires, dont un certain nombre ont incorporé des bacilles; ils abondent de plus en plus à mesure que les bacilles deviennent plus rares. Les bacilles libres ont à peu près disparu à la fin de la 3^e heure : on a quelque peine à en trouver. Vers la 5^e heure, apparaissent de grands mononucléaires.

On voit, dès la première demi-heure, dans l'exsudat des cobayes tuberculeux, des bacilles libres qui prennent le Ziehl plus faiblement que les bacilles normaux. On voit un certain nombre de formes altérées, courbées, raccourcies ou amincies, comme rongées, ou même réduites en granules : ce sont les formes qui sont prises comme indices d'une lyse humorale. On voit dans les polynucléaires, puis dans les mononucléaires, des formes analogues, indices d'une lyse intracellulaire. Mais on peut affirmer catégoriquement, d'après des examens répétés, que non seulement de pareilles formes existent dans l'exsudat des cobayes neufs, mais qu'il y en a déjà dans la culture qui a fourni les bacilles.

Chez certains cobayes tuberculeux, ces formes altérées paraissent plus nombreuses que chez les témoins neufs; mais le fait, qui dépend pour une part des hasards des prélèvements, est loin d'être constant. Dans la généralité des cas, on peut mettre au défi un observateur non prévenu de distinguer sous le microscope l'exsudat de cobaye neuf de l'exsudat de cobaye réinoculé. Quant aux granulations, que décrivent Kraus et Hofer, dérivées de bacilles bactériolysés, apparaissant nombreuses dès la première demi-heure, ne gardant plus le Ziehl et prenant seulement la contre-coloration bleue, ces auteurs sont les seuls à les avoir vues.

Même au bout de sept, dix et vingt-quatre heures, si l'on a soin de faire la même coloration sur les deux exsudats, les bacilles englobés par les polynucléaires ne sont pas différents chez les cobayes neufs et chez les cobayes tuberculeux; si chez ces derniers on voit des bacilles en partie réduits en granules (d'ailleurs parfaitement acido-résistants), ces images sont rares, et elles ne font pas défaut dans l'exsudat de cobayes neufs. Bien entendu la bonne méthode, dans ces examens, ne

consiste pas à rechercher exclusivement les bacilles altérés chez les cobayes tuberculeux et les bacilles normaux chez les cobayes neufs, mais aussi, avec non moins d'attention, les bacilles altérés chez les cobayes neufs et les bacilles d'aspect normal chez les cobayes tuberculeux. On voit alors s'évanouir les différences si nettes que les auteurs ont signalées entre les deux exsudats, et que j'avoue ne pas avoir vues malgré mon désir de les retrouver.

Ce n'est pas à dire que cobayes tuberculeux et cobayes neufs se comportent de la même façon, loin de là ; mais les différences ne sont pas inscrites sur les préparations et les phénomènes essentiels ne se voient pas au microscope. La différence, c'est que le cobaye tuberculeux fait une réaction tuberculinique, tandis que le cobaye neuf n'en fait pas.

Dans l'exsudat du cobaye tuberculeux, les polynucléaires phagocytants semblent moins nombreux que dans l'exsudat de cobaye neuf : mais il faut tenir compte de ce que l'exsudat étant plus abondant chez le cobaye tuberculeux les cellules y sont moins denses. Bien plus, si (les animaux étant sacrifiés de la 7^e environ à la 24^e heure) on centrifuge les exsudats de façon à isoler dans des tubes effilés de même calibre les éléments cellulaires, on voit que malgré son volume moindre le liquide d'exsudat du cobaye neuf renferme, en quantité absolue, beaucoup plus de cellules que l'autre, — de 3 à 5 fois plus. En outre, les bacilles s'agglutinent plus vite en amas chez le cobaye tuberculeux que chez le cobaye neuf. Il ne faut donc pas s'étonner de trouver chez le cobaye neuf, dans une goutte portée sur lame, cette plus grande abondance de polynucléaires phagocytants, qu'on a opposée à la prétendue disparition lytique chez le cobaye tuberculeux.

A l'autopsie des cobayes, sacrifiés de la 8^e à la 24^e heure, mêmes observations. L'exsudat très pauvre du cobaye neuf est plus riche en bacilles phagocytés que l'exsudat abondant du cobaye tuberculeux. Au point de vue de la conservation et de la coloration des bacilles, on peut trouver dans certains cas des formes plus endommagées, peut-être aussi plus faiblement colorées, chez le cobaye tuberculeux. La différence n'est pas frappante et elle n'est pas constante.

Mais il ne faut pas considérer seulement l'exsudat.

En dehors de l'exsudat, où sont allés les bacilles? 1° Si l'on gratte soigneusement avec une spatule le péritoine pariétal et la séreuse qui recouvre les anses de l'intestin, les préparations montrent la présence d'assez nombreux bacilles, par petits paquets (presque tous phagocytés) chez le cobaye neuf; on en trouve très peu ou on n'en trouve pas chez le cobaye tuberculeux.

Cette constatation se rencontre avec celle-ci, à laquelle Rist, Léon-Kindberg et Rolland (1) attachent une importance capitale : on ne voit jamais, chez les cobayes tuberculeux, qui ont survécu des semaines à la réinoculation, cette tuberculose à granulations du péritoine pariétal et de la séreuse que l'on voit à la suite d'une première inoculation dans le péritoine; il existerait donc chez le cobaye tuberculeux une immunité de la séreuse.

Mais, comme on en trouvera la preuve plus loin, cette affirmation n'est pas exacte.

2° Si l'on fait des préparations de l'épiploon, on y trouve des masses énormes de bacilles; ces amas de bacilles (englobés par des leucocytes qui se sont déposés sur l'épiploon) paraissent encore plus massifs et se forment en tout cas plus vite chez le cobaye tuberculeux. Il y a aussi des masses de bacilles, phagocytés ou entourés de cellules, dans ces flocons ou dépôts fibrineux, qui sont plus abondants chez le cobaye tuberculeux que chez le cobaye neuf.

Ce qui saute aux yeux, c'est que la presque totalité des bacilles sont transportés sur l'épiploon.

Il est singulier que plusieurs observateurs n'en parlent pas ou n'en fassent qu'une mention secondaire. Ceux qui affirment la lyse humorale sont ceux qui parlent le moins de l'épiploon. Selon Arima et Sakamura, cet entraînement en masse des bacilles sur l'épiploon serait le propre du cobaye neuf. Kraus et Hofer n'en parlent pas. Manwaring et Bronfenbrenner (2) reconnaissent qu'une forte partie de bacilles gagnent l'épiploon. Rist parle de dépôts d'aspect fibrineux, extrêmement chargés de bacilles, qui flottent dans l'exsudat ou se déposent sur les

(1) Etudes sur la réinfection tuberculeuse, *Annales de Médecine*, t. I, f. 3 et 4, mars-avril 1914.

(2) MANWARING et BRONFENBRENNER, On intraperitoneal lysis of tubercle bacilli, *Journ. of exp. Medicine*, t. XVIII, f. 6, p. 604.

viscères, il ne mentionne pas d'examen propre de l'épiploon.

Or on ne peut comprendre les préparations d'exsudat qu'en les comparant avec les préparations d'épiploon. Il est évident que les bacilles qui disparaissent si rapidement de l'exsudat sont entraînés sur l'épiploon par les cellules : c'est le sort banal de tous les microbes et, en général, de tous les corps étrangers introduits dans le péritoine, qu'il s'agisse de grains de carmin ou de bacilles de Koch. Si l'exsudat du cobaye tuberculeux s'appauvrit plus vite en bacilles et même en cellules, c'est que les bacilles sont entraînés plus vite et plus violemment sur l'épiploon.

Ce qui caractérise le cobaye tuberculeux, c'est la réaction tuberculinique ; or, on sait que la tuberculine provoque un fort appel de polynucléaires, comme le prouve l'examen histologique d'une cutiréaction (1). Quant aux bacilles des flocons et de l'épiploon, presque tous sont parfaitement colorés et d'aspect normal, et les formes altérées se trouvent chez le cobaye neuf comme chez le tuberculeux.

Lorsqu'on fait la réinoculation dans la plèvre au lieu de la faire dans le péritoine, on observe les mêmes faits. Le péricarde et les ligaments qui l'attachent au diaphragme jouent le rôle de l'épiploon, mais d'une façon beaucoup moins prononcée. Quelques heures après l'injection dans la plèvre, on trouve des bacilles qui sont passés dans la cavité péritonéale et se sont fixés sur l'épiploon.

Après injection dans le péritoine, on trouve des bacilles dans le sang. Ils y passent (dès la 4^e heure) en assez grand nombre, puisque avec la méthode Staübli-Schnitter on les retrouve sans peine sur les préparations. On objectera qu'il y a des bacilles dans le sang des cobayes tuberculeux, même non réinoculés. Mais on en trouve (quoique peut-être en moindre quantité) dans le sang des cobayes neufs fraîchement inoculés dans le péritoine. Donc les bacilles sont en partie absorbés par les lymphatiques, contrairement à l'opinion de Manwaring et Bronfenbrenner.

En somme, la rapide disparition des bacilles libres est affaire de phagocytose et la presque totalité des bacilles sont entraînés

(1) E. BURNET, *C. R. de la Soc. de Biologie*, 1907, t. LXII, p. 1156.

sur l'épiploon, avec plus d'énergie chez le cobaye tuberculeux que chez le cobaye neuf. L'aspect de l'épiploon, congestionné, tuberculinique, montre à quel point cet organe est en jeu. Pas de dissolution rapide dans les humeurs (surtout pas en 30 à 60 minutes, comme le disent Kraus et Hofer); et même pas de destruction cellulaire *rapide*. Quant à un phénomène de Pfeiffer dans le péritoine du cobaye tuberculeux, cela n'existe pas.

Y A-T-IL DES PREUVES DIRECTES D'UNE BACTÉRIOLYSE?

La réduction en granules des vibrions cholériques est facile à voir au microscope. De même, selon Deycké et Much, Kraus et Hofer, la « tuberculolyse », qui est déjà manifeste chez le cobaye neuf (une à plusieurs heures après l'inoculation), plus intense, et plus rapide (déjà après 15-30 minutes) chez le cobaye tuberculeux. Ils voient dans les bacilles colorés en rose faible des granulations bleues « de telle sorte que les bacilles tuberculeux ressemblent beaucoup aux bacilles diphtériques... *Il semble qu'il y ait dans le sérum des substances qui conditionnent la bactériolyse péritonéale* ».

Aucun autre observateur n'a vu cette bactériolyse.

« Nous n'avons jamais vu ces granulations », disent Rist, L. K. et R. — Manwaring et Bronfenbrenner reconnaissent qu'à cause de l'épiploon il est bien difficile de prouver la bactériolyse. « La seule preuve directe que nous en ayons obtenue était fournie par des préparations d'exsudat de cobayes tuberculeux faites 30 minutes environ après l'injection. *Dans un cas*, on voyait de nombreux granules acido-résistants, fragments indubitables de bacilles. Quant à des granules non acido-résistants (granules de Much), on en voit habituellement chez les cobayes normaux comme chez les tuberculeux et on ne peut les prendre pour preuve d'une lyse spécifique ».

Il faudrait pouvoir exposer les bacilles aux humeurs du péritoine sans les exposer aux leucocytes : les sacs de collodion ordinaire ne peuvent servir, parce qu'ils empêchent la pénétration des humeurs telles qu'elles sont dans le péritoine. On peut au moins laisser affluer les humeurs tout en retardant l'arrivée des leucocytes (ce qui doit suffire, la bactériolyse étant donnée comme très prompte) en les enfermant dans un petit sac en papier-filtre : c'est le dispositif imaginé par Metchnikoff dans ses anciennes expériences sur la phagocytose du bacille

charbonneux chez la grenouille. On enroule un fragment de papier de façon à en faire un petit tube; quelques gouttes d'une suspension de bacilles y sont placées entre deux ligatures. Ce sac est retiré du péritoine au bout de plusieurs heures. Les choses s'y passent comme dans une petite cavité péritonéale : les bacilles disparaissent plus vite du sac chez le cobaye tuberculeux que chez le cobaye neuf : on les retrouve, phagocytés, sur les faces interne et externe de la paroi en papier. Le sac du cobaye tuberculeux est plus sanguinolent, plus chargé de leucocytes, tout comme un épiploon de cobaye tuberculeux. Le liquide qu'on en retire est plus clair que dans le cas du cobaye normal, les bacilles y sont (après plusieurs heures) agglutinés en amas : dans le sac du cobaye normal ils ne seront agglutinés au même degré que le lendemain.

Le contenu d'un sac, resté 2-3 jours dans le péritoine d'un cobaye tuberculeux, a tuberculisé aisément le cobaye sain. Si les humeurs sont capables de dissoudre en deux heures la plus grande partie de 10 milligrammes de bacilles que l'on injecte couramment dans ces expériences, comment des bacilles en quantité infiniment moindre résistent-ils plusieurs jours ?

Voici une expérience encore plus démonstrative. Le bord de la feuille de papier enroulée et les ligatures du sac sont obturés au collodion, de telle sorte que le sac soit encore moins perméable aux leucocytes. Une faible quantité de bacilles — 1/10 de milligramme — passe dans 3 péritoines tuberculeux, en changeant de sac (pour éviter le colmatage des pores du papier). Il y a certainement une déperdition de bacilles, à cause des manipulations et parce que des leucocytes traversent le papier. A la fin, on ne trouve pas de bacille à l'examen microscopique, et cependant la faible quantité du liquide que l'on retire tuberculise le cobaye :

0,1 milligramme de bacilles tuberculeux dans un sac bordé au collodion. Séjour de 18 heures dans le péritoine d'un cobaye tuberculeux (tuberculose de 78 jours : à l'autopsie, ganglions, grosse rate tuberculeuse, tuberculose discrète des poumons).

Le contenu du sac est porté dans un sac neuf et mis dans le péritoine d'un 2^e cobaye tuberculeux (tuberculose de 49 jours). Vu dans une goutte de ce contenu : polynucléaires, mononucléaires; polynucléaires phagocytants; bacilles en bon état. Séjour dans ce cobaye, 22 heures.

Report du contenu dans un sac neuf et chez un 3^e cobaye tuberculeux

(tub. de 4 semaines). Vu dans une minime gouttelette quelques bacilles bien colorés, à l'intérieur d'un leucocyte.

Le lendemain, le contenu est prélevé. On lave soigneusement avec 3-4 gouttes d'eau stérile, à l'aide d'une pipette fine, l'intérieur du sac. Pas vu de bacilles au microscope. Inoculation sous la peau du ventre à deux jeunes cobayes qui sont sacrifiés après 51 jours. Tous deux sont tuberculeux (ganglions et rate; — poumons chez l'un) sans chancre, comme après les inoculations de doses très faibles.

ÉVALUATION DE LA QUANTITÉ DE BACILLES RETROUVÉS DANS LE PÉRITOINE PLUSIEURS HEURES APRÈS LA RÉINOCULATION.

Manwaring et Bronfenbrenner prélèvent l'exsudat une heure et demie après l'injection, lavent le péritoine à l'eau citratée, réunissent les liquides de lavage, traitent par l'antiformine, centrifugent, mettent le culot en suspension dans un volume connu de sérum, ajoutent une quantité connue de leucocytes, et comptent les bacilles recueillis en rapportant leur nombre à celui des leucocytes. Ils retrouvent, en moyenne, dans le péritoine normal 106 p. 100 des bacilles injectés, c'est-à-dire qu'il y a eu croissance légère, et 65 p. 100 seulement dans le péritoine du cobaye tuberculeux. La différence, 35 p. 100, mesure la quantité détruite par le péritoine du cobaye tuberculeux.

Cette expérience est discutable. Il y a trois éléments en jeu, les bacilles en suspension, les bacilles fixés sur l'épiploon, les bacilles supposés détruits. Il ne suffit pas d'en évaluer un seul pour être renseigné sur l'un des deux autres. L'entraînement sur l'épiploon et la phagocytose étant plus intenses chez le cobaye tuberculeux, les deux exsudats ne se correspondent pas et l'évaluation des bacilles de l'exsudat ne donne pas la quantité de bacilles détruits. L'expérience serait bonne si, en lavant le péritoine, on pouvait reprendre les bacilles déjà fixés : mais *on ne lave pas l'épiploon*; après l'avoir agité fortement tour à tour dans de l'eau physiologique, de l'eau légèrement alcalinisée, de l'eau légèrement acidulée, on y retrouve encore une grande quantité de bacilles en paquets. Comment tenir compte aussi des flocons, chargés de bacilles, qui se forment dans le péritoine? De plus, l'antiformine n'agit pas favorablement. Si elle permet de faire d'abord une bonne suspension, la centrifugation agglutine le flocon fibrineux en un coagulum qu'il est impossible de dissocier parfaitement. Ensuite, la numération n'a plus de sens, tant est irrégulière la répartition des bacilles : comme au moment du prélèvement il n'y a que très peu de bacilles libres, presque tous ceux que l'on retrouve sont adhérents à des débris de cellules et forment des amas incomptables.

La technique suivante est plus simple et meilleure. On inocule au cobaye, avant de le sacrifier, un peu de solution citratée qui empêche la coagulation de l'exsudat; après prélèvement du liquide, on lave le péritoine à l'eau citratée; bien entendu, on ne reprend pas plus que dans le cas précédent

les bacilles fixés. Le liquide est amené à un volume connu et l'on y ajoute une quantité connue de globules rouges *nucléés*, par rapport auxquels on compte les bacilles. Inutile de centrifuger et de remettre en suspension. On soumet aux mêmes manipulations une suspension de bacilles identique à celles qui ont été injectées. La numération est plus facile qu'avec la première technique, mais il s'en faut encore de beaucoup qu'elle soit sûre. Même en agitant les liquides avec des billes de verre (quantités égales de billes pour chacun), on ne peut éviter la formation d'amas.

En opérant avec tout le soin possible, j'ai trouvé qu'il a disparu de l'exsudat, dès la fin de la première heure, non pas 40 p. 100, mais de 90 à 98 p. 100 de bacilles injectés, et que les chiffres sont à peu près les mêmes pour le cobaye neuf et le cobaye tuberculeux.

1. — EXPÉRIENCE SUR DES EXSUDATS RETIRÉS APRÈS 1 HEURE.

	bac. retrouvés	disparus
Suspension témoin	100	—
Cob. neuf	8	92
Cob. tub. 1	2	98
Cob. tub. 2	1,8	98,2
Cob. tub. 3	10	90

2. — EXPÉRIENCE SUR DES EXSUDATS RETIRÉS APRÈS 4 H. 1/2.

Suspension témoin	100	—
Cob. neuf	2,5	97,5
Cob. tub. 1	4	96
Cob. tub. 2	2	98

Manwaring et Bronfenbrenner essaient de prouver la bactériolyse par une expérience *in vitro* qui met en jeu les cellules fixes du revêtement péritonéal. Ils plongent dans une suspension tiède de bacilles et mettent plusieurs heures à l'étuve des organes abdominaux de cobaye tuberculeux et de cobaye sain : ils trouvent que le nombre des bacilles augmente dans le cas du cobaye neuf et diminue considérablement dans le cas du cobaye tuberculeux.

J'ai répété cette expérience en employant tantôt l'intestin grêle, tantôt le tube digestif abdominal dans sa totalité, estomac, épiploon et cæcum. J'ai retrouvé à très peu près le même nombre de bacilles dans les deux cas. Un grand nombre disparaissent parce qu'ils s'attachent mécaniquement aux parois, où on les retrouve avec une forme et une coloration

normales. L'épiploon est resté inerte; après plusieurs heures d'immersion, on n'y voit ni figures de phagocytose ni aspects de bactériolyse. Même inertie de la part des cellules à noyau rond, desquamées du péritoine, que l'on recueille en grande quantité en centrifugeant le liquide: les bacilles mêlés aux cellules sont aussi bien colorés, dans les deux cas, que sur une préparation faite avec la culture d'origine.

VIRULENCE DES EXSUDATS DE RÉINOCULATION.

D'après Rist et ses collaborateurs, dans beaucoup de cas, on ne réussit pas à donner la tuberculose avec 1 cent. cube d'exsudat péritonéal de cobaye tuberculeux réinoculé où l'on découvre aisément, au microscope, des bacilles tuberculeux, mais altérés dans leur forme et prenant mal la coloration; on ne donne qu'une tuberculose très lente avec des exsudats contenant une grande quantité de bacilles: c'est qu'il n'y reste que peu d'unités virulentes. Donc les bacilles sont tués dans l'exsudat avant d'être détruits dans les leucocytes.

Sur 12 inoculations d'exsudats obtenus par réinoculation de 10 à 20 milligrammes de bacilles, ces auteurs ont eu 7 cas négatifs (exsudats de 3 jours, 3 1/2, 3 1/4, 7, 24, 20, 4 1/2 heures) et 5 positifs (exsudats de 5, 6, 6, 16, 16 heures).

J'ai constaté la virulence de l'exsudat dans tous mes cas sans exception, même avec moins de 1 cent. cube d'exsudats provoqués, non par 10 et 20, mais seulement par 5, par 3 et même 2 milligrammes de bacilles, et lors même qu'au microscope on ne voyait pas de bacilles dans le liquide inoculé. J'ajoute qu'en prélevant l'exsudat, je prenais soin de ne pas toucher avec la pipette les organes tuberculeux et l'épiploon chargé de bacilles, et de ne pas aspirer de ces flocons fibrineux, toujours riches en bacilles. Si les cobayes se tuberculisent lentement, le fait n'a rien d'étonnant, puisque l'exsudat s'appauvrit en bacilles très rapidement.

On tuberculise très bien les cobayes neufs auxquels on insère sous la peau un mince lambeau d'épiploon de cobaye réinjecté dans le péritoine depuis 3, 10, 15 et même 17 jours, et plus. (Tableau I.)

TABLEAU I. — Virulence de l'exsudat péritonéal de réinoculation.

Les 5 premiers cobayes sont d'une même série (tub. de 45 jours).

COBAYES	A RECU	SACRIFIÉ après	VU BAC. T. dans l'exsudat.	QUANTITÉ inoculée sous la peau. par cobaye	n	RÉSULTATS
1	5 mgr	8 h.	+	2,5 c.c.	2 cob.	Tub.. L'un a le 40 ^e jour rate et poumons tuberculeux.
2	15 mgr	20 h.	+	2 c.c.	1 cob.	Tub.. Mort le 38 ^e jour. Rate et poumons tuberculeux.
3	5 mgr	25 h.	+	1 c.c. 2 c.c.	2 cob.	Tub. . Évolution lente.
4	2 mgr	50 h.	+	0,25 c.c.	3 cob.	Tub. . Début lent.
5	2 mgr	70 h.	+	0,33 c.c.	2 cob.	Tub. L'un, tub. lente; l'autre, mort le 12 ^e jour; bac. tub. dans ganglion inguinal.
6	3 mgr	48 h.	+	2,5 c.c.	2 cob.	Tub.. L'un, mort prématurément; l'autre tub.
7	3 mgr	48 h.	+	0,3 c.c.	2 cob.	Tub.. L'un, mort le 8 ^e jour; l'autre le 12 ^e jour; ganglion avec bacille tuberculeux.
8	3 mgr	72 h.	—	0,25 c.c.	2 cob.	Tub. lente.
9	Faible quantité contenue dans un sac en papier, deux jours dans le péritoine.				3 cob.	Tub.
10	15 mgr	24 h.	+	0,33 c.c.	3 cob.	Tub.
11	15 mgr	48 h.	+	0,75 c.c.	2 cob.	Tub.
12	15 mgr	96 h.	+	1,7 c.c.	2 cob.	Tub.

Réinoculation de l'épiploon.					
1	{	des cob. ci-dessus 11 et 12.	retiré après	2 jours.	2 cob. Tub.
2				4 jours.	2 cob. Tub.
3	{	d'un cob. réin. avec 3 mgr.	retiré après	17 jours.	2 cob. Tub.
4				4 jours.	2 cob. Tub.
Épiploon de cob. tub. réin., ayant fait passages consécutifs par 3 péritonées de cobayes tuberculeux (b. bovin).					
					6 cob. Tub.

ÉTAT DU PÉRITOINE DES COBAYES TUBERCULEUX
QUI ONT SURVÉCU A LA RÉINOCULATION PÉRITONÉALE.

Lorsque les cobayes tuberculeux survivent à la réinoculation et qu'ils succombent ou sont sacrifiés au bout de plusieurs

semaines, l'autopsie, disent Rist, Léon-Kindberg et Rolland, « ne montre que des lésions viscérales dues à la diffusion de la tuberculose initiale. Elle ne permet de constater aucune lésion due à la réinfection intrapéritonéale : la séreuse est intacte et l'on n'y voit pas de granulations tuberculeuses ».

Je nie cette conclusion. Même si la séreuse était intacte et exempte de granulations, la réinfection laisserait des traces qui sautent aux yeux, car, dans tous les cas, on observe d'énormes lésions de l'épiploon, qui est transformé en un gros cordon ou en boules adhérents à l'estomac et aux anses intestinales. Lorsque l'on tranche transversalement ce cordon, la coupe est tout à fait pareille à celle d'un ganglion lymphatique en train de se caséifier. Il y a, sur la surface et sur la coupe de l'épiploon des amas considérables de bacilles qui ne paraissent pas plus dégénérés après quarante jours qu'après huit heures. On en voit qui paraissent endommagés, mais la grosse majorité prennent très bien la coloration; il y a plus de formes longues qu'on n'en voyait dans la culture. En admettant qu'une partie des bacilles soient détruits, il est certain qu'un grand nombre se conservent et créent des lésions pour leur propre compte. Peut-on parler d' « intégrité absolue du péritoine? »

Mais il n'est pas vrai que la séreuse soit intacte et exempte de granulations. La séreuse des cobayes tuberculeux réinoculés dans le péritoine ne se comporte pas autrement que celle des cobayes neufs : on trouve des granulations sur la face abdominale du diaphragme et sur le péritoine pariétal, plus ou moins nombreuses selon les cobayes, mais de même aspect et de même grosseur dans les deux séries. (Tableau II.)

Dans le tableau II, les 7 premiers cobayes doivent être mis à part, parce que, la 1^{re} inoculation ayant été faite *sous la peau du ventre*, on pourrait dire qu'elle est la cause des granulations qui ont suivi la réinoculation dans le péritoine. Il n'en est rien, parce que chez ces cobayes la paroi musculaire était intacte. D'ailleurs, on voit par centaines, dans les laboratoires, des cobayes tuberculisés par inoculation sous la peau du ventre et n'ayant aucune granulation sur la séreuse, malgré la tuberculose de la rate, du foie et des ganglions lombaires.

Chez les 5 cobayes suivants, la première inoculation a été faite sous la peau de la cuisse.

TABLEAU II.

N ^{OS}	PREMIÈRE INOCULATION	REINOCULATION PÉRITONÉALE (3 milligr.)	SACRIFIÉS	ÉTAT DU PÉRITOINE	ÉTAT DES ORGANES
<i>Cobayes tuberculeux réinoculés dans le péritoine.</i>					
1	Date, mai. 9	Date, juin. 22	Date, juil. 20	Grosse corde épiploïque avec adhérences. Semis de granu- lations sur le péritoine pariétal.	Gros ganglions caséeux. Tuber. rate et poulmons.
2	9	22	20	Gran. sur le diaphragme; peu sur le périt. pariétal. Corde épiploïque avec adhé- rences.	Id.
3	5	22	20	Très nombreuses gran. sur la paroi, pas sur le diaphragme. Epiploon ramassé avec adhé- rences.	Id.
4	5	22	6	Epiploon ramassé avec adhé- rences. Semis de gran. sur la paroi.	Id.
5	2	22	20	Epiploon ramassé avec adhé- rences. Gros semis de gran. sur le diaphragme et sur la paroi.	Id.
6	2	22	20	Les granulations tub. couvrent presque tout le périt. pariétal. Epiploon ramassé avec adhé- rences.	Id.
7	avril. 17	22	17	Granul. nombreuses sur dia- phragme et péritoine. Epiploon ramassé avec adhé- rences.	Id.
8	mai. 30	22	6	Gran. sur le diaphragme et sur la paroi. Epiploon ramassé avec adhé- rences.	Id.
9	30	22	6	Nombreuses gran. sur le dia- phragme et sur la paroi. Epiploon ramassé avec adhé- rences.	Id.
10	30	22	17	Epiploon ramassé et adhérent. Nombreuses gran. diaphr. et paroi.	Id.
11	30	22	17	Epiploon ramassé et adhérent. Semis de granul. sur le diaphr. et sur une partie de la paroi.	Id.

N ^{os}	PREMIÈRE INOCULATION	RÉINOCULATION PÉRITONÉALE (3 milligr.)	SACRIFIÉS	ÉTAT DU PÉRITOINE	ÉTAT DES ORGANES
12	30	22	17	Epiploon ramassé et adhérent. Semis de granul. sur le diaphr. et paroi.	Id.
<i>Cobayes témoins, inoculés pour la première fois dans le péritoine même culture et même dose (3 milligrammes).</i>					
1	Date, mai. 30	Date. »	Date, juin. +2 0	Granul. peu nombreuses sur le diaphragme et sur la paroi au-dessous du diaphragme. Epiploon ramassé, caséux.	Début de tuberculose pulmonaire.
2	30	»	juil. 6	Epiploon ramassé, caséux. Granul. plus nombreuses.	Id
3	30	»	6	Gran. seulement sur le diaphr.	Id.
4	30	»	6	Gran. seulement sur le diaphr.	Id.
5	30	»	6	Epiploon ramassé et adhérent. Gran. seulement sur le diaphr.	Id.
6	30	»	6	Gran. abondantes sur le dia- phragme et sur la paroi.	Id.

DESTRUCTION DES BACILLES DANS LES CELLULES.

On ne peut qu'être d'accord avec Rist pour dire que s'il y a destruction de bacilles, c'est à l'intérieur des phagocytes. Nous avons vu aussi des phagocytes qui ne contiennent qu'une sorte de poussière acido-résistante : mais ils sont très rares, et même à l'intérieur des phagocytes les bacilles ne sont pas détruits en quelques heures.

Il y a un moyen de renforcer l'action du péritoine de cobaye tuberculeux sur les bacilles réinjectés, c'est de faire passer les bacilles de cobaye à cobaye. On ne peut insérer l'épiploon tout d'une pièce dans le péritoine du cobaye suivant, par laparotomie ; les chances d'infection seraient trop grandes. Il faut inoculer l'épiploon avec une grosse aiguille, après l'avoir réduit en pâte et mis en suspension, ce qui n'est possible qu'après

l'avoir desséché dans le vide et broyé dans un mortier. En examinant le péritoine à chaque passage, on voit que les bacilles se raréfient rapidement et que leur forme s'altère. Ce n'est cependant qu'après le quatrième passage qu'ils sont rares au point d'être difficiles à trouver au microscope. On en voit encore au sixième passage. Il faut éviter une cause d'erreur, qui consisterait à érailler les organes du cobaye et à prélever quelques-uns de ses propres bacilles tuberculeux. Beaucoup de bacilles échappent aux prélèvements, et tous ceux qui manquent n'ont pas été détruits.

Des bacilles de troisième passage, ayant séjourné six jours dans les péritoines de cobayes tuberculeux et une dizaine de jours en dehors de l'organisme (dans la cloche à vide) ont tuberculisé les cobayes. Une inoculation de sixième passage (où quelques bacilles ont été vus au microscope) n'a pas tuberculisé.

La disparition des bacilles se fait à peu près de même au cours des passages par cobayes neufs : la raréfaction paraît moins rapide et il y a moins de formes altérées. Des cobayes inoculés avec une inoculation de quatrième passage ne sont pas devenus tuberculeux.

Il est certain que les cellules du péritoine détruisent peu à peu les bacilles tuberculeux dans les conditions de cette expérience, où les tissus sont tués à chaque passage. Il n'y a pas de différence du tout au tout entre cobayes neufs et cobayes tuberculeux.

RÉSISTANCE AUX RÉINOCULATIONS.

Il n'y a donc pas de destruction humorale, et la destruction phagocytaire est très lente. Les auteurs qui croient à une lyse rapide expliquent la résistance aux réinfections par l'action d'anticorps circulants, n'est pas démontré. Manwaring et Bronfenbrenner, qui ont fait en vain toutes sortes d'expériences pour les mettre en évidence, concluent qu'il est seulement possible qu'ils soient pour quelque chose dans la bactériolyse, laquelle s'accomplirait surtout sous l'influence des cellules fixes du péritoine. Le même pouvoir lytique, ajoutent-ils, appartient sans doute aussi à d'autres cellules fixes de l'organisme. Mais si cette lyse plus ou moins rapide existait chez un

organisme résistant, comme l'homme, et soumis presque toujours à des réinfections faibles, comment les réinfections réussissent-elles — s'il est vrai qu'elles sont la cause de la phthisie — à moins de croire qu'elles soient toujours « endogènes » et que vis-à-vis d'elles l'organisme n'ait pas de défense ?

A ces expériences qui consistent à réinoculer dans le péritoine de cobayes tuberculeux des doses colossales de bacilles, s'en opposent d'autres, très nombreuses, qui se rapprochent beaucoup plus des conditions naturelles, tant par les doses employées que par la durée des observations. Ce sont les essais de bovovaccination d'après Behring. Depuis l'expérience de Melun, de Vallée et Rossignol, jusqu'aux expériences récentes de Calmette (1), en passant par celles de Römer, il a été montré dix fois pour une que les bacilles inoculés pour éprouver les animaux vaccinés et résistants peuvent bien ne pas causer de tubercules, mais qu'ils se conservent vivants et virulents même pendant 18 mois. Ces faits ne sont pas en faveur d'une bactériolyse.

La « tuberculolyse » ne s'accorde pas non plus avec les observations classiques de Metchnikoff sur la digestion lente des bacilles dans les cellules géantes du spermophile et dans les cellules géantes de la rate de la gerbille (2). Il est vrai que dans ces observations il ne s'agit pas de réinfections, et Kraus et Hofer attribuent la résistance des primo-infectés à la phagocytose, et spécialement la résistance des réinfectés à la bactériolyse humorale. Mais les corps calcaires, analogues à ceux de la gerbille, décrits par Schüppel et autres dans les ganglions tuberculeux chez l'homme, répondent-ils nécessairement à des lésions de première infection ?

S'il est exagéré de dire que pour le tuberculeux le bacille est *exclusivement* toxique, il est certain qu'il l'est à un haut degré, comme il ne l'est pas pour le cobaye neuf. Rist a montré que l'exsudat de réinoculation intrapéritonéale exerce une action toxique, violente et immédiate, sur le cobaye tuberculeux, et non sur les cobayes normaux. Il faut donc un organisme tuberculeux, et pour préparer le poison, et pour le recevoir. Mais

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, avril 1914.

(2) *Pathologie comparée de l'inflammation*, p. 392 et suivantes.

rien ne prouve que l'action toxique ait pour condition une fonte rapide de corps bacillaires. Les actions dites *anaphylatoxiques*, quelle qu'en soit la nature, ne consistent pas essentiellement en une destruction de microbes.

J'ai fait aussi des essais variés pour créer la sensibilité à la tuberculine chez le cobaye neuf en le préparant avec de l'exsudat péritonéal de cobayes tuberculeux réinoculés. Inoculé dans le péritoine avec 3-5 cent. cubes de cet exsudat, le cobaye neuf fait presque toujours une réaction thermique (de 1, 1 1/2 et même 2 degrés), vers la quatrième heure; jamais de malaise visible, jamais la mort, jamais de sensibilité à la cuti-réaction. On obtient d'ailleurs la même élévation thermique en injectant des exsudats préparés avec le *B. subtilis*.

En somme, la seule notion que nous ayons acquise depuis que Koch a décrit le phénomène qui porte son nom est celle d'une action lytique dont le mécanisme reste inexpliqué et dont nous ne connaissons que l'effet toxique. Je ne dis pas que toutes les lésions tuberculeuses d'un homme tuberculeux doivent être mises sur le même plan, je ne nie pas cet état d'*allergie* dont on abuse peut-être. On peut, avec Besançon et de Serbonnes (1), donner un sens bactériologique à la notion de terrain tuberculeux. Mais c'est autre chose que de la bactériolyse, et l'exsudat péritonéal de réinoculation ne montre pas ce que l'on a voulu y voir.

CONCLUSIONS.

1. Il ne se produit pas, dans le péritoine des cobayes tuberculeux réinoculés, de phénomène analogue au phénomène de Pfeiffer.

2. Les formes altérées que l'on trouve dans le péritoine du cobaye tuberculeux réinoculé ne font défaut, ni chez le cobaye inoculé pour la première fois, ni dans la culture qui fournit les bacilles.

3. Les bacilles qui disparaissent de l'exsudat ne sont pas

(1) *Annales de Médecine*, t. I, f. 4, et *Journal de Médecine interne*, 10 juin 1914.

détruits. La presque totalité est phagocytée et fixée sur l'épiploon. Il en passe dans le sang par les voies lymphatiques. La phagocytose et l'entraînement sont plus intenses et plus rapides chez le cobaye tuberculeux que chez le cobaye neuf.

4. Les cobayes tuberculeux qui survivent à la réinoculation intrapéritonéale présentent d'énormes lésions de réinoculation sur l'épiploon. Leur séreuse n'est pas intacte, ni exempte de granulations tuberculeuses, ni douée d'immunité. Elle se comporte comme celle des cobayes neufs.

5. L'exsudat de cobaye tuberculeux réinoculé est toujours virulent.

6. Les bacilles détruits le sont par phagocytose; la destruction par les cellules est une digestion lente.

7. Les réinoculations massives dans le péritoine des cobayes ne représentent pas ce qui se passe dans les réinfections naturelles. Les réinoculations aux bovidés vaccinés et résistants ont établi que les bacilles d'épreuve se conservent longtemps vivants et virulents dans les tissus.

Juillet 1914.

L'ACIDE BUTYRIQUE ET LA SCLÉROSE

par GEORGE-E. COLEMAN.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

(Avec la planche III.)

Depuis les recherches de Gilbert et Lion (1), en 1889, et de Josué (2), en 1900, de nombreux chercheurs ont réussi à produire des lésions sclérotiques dans les organes d'animaux au moyen d'injections de microbes et de leurs toxines, ainsi que de substances chimiques diverses. Pendant ces dernières années, un grand nombre de recherches ont été entreprises dans le but d'élucider le rôle joué par certaines substances, élaborées dans l'organisme même, dans la production de la sclérose.

Pour Metchnikoff, le facteur qui joue le rôle prédominant dans la production de la sclérose en général et de la sénilité précoce, est l'intoxication du système due à l'absorption continue, à petites doses et pendant une longue période, des produits de la putréfaction intestinale.

En parlant, en particulier, de l'indol et du phénol, Metchnikoff (3) dit que, les bactéries de l'intestin produisant seulement de petites quantités de ces substances toxiques, l'influence de ces dernières sur l'organisme ne peut se manifester que sous la forme d'intoxication chronique, ce qui suppose, de leur part, une action cumulative.

Cette idée de Metchnikoff n'est plus une hypothèse, mais un fait bien établi, démontré par ses propres expériences avec le paracrésol (4), ainsi que par celles de plusieurs autres observateurs.

Dans la production expérimentale de l'artério-sclérose, on a

(1) GILBERT et LION, Artérites expérimentales. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1889.

(2) JOSUÉ, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1903.

(3), (4) METCHNIKOFF, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIV, 1910, p. 761.

donné généralement des doses massives de diverses substances pendant une période relativement courte. Afin de vérifier la théorie de l'action cumulative de petites doses de poisons intestinaux, on a dernièrement, poursuivant les recherches abordées par Metchnikoff lui-même, administré de faibles quantités de ces substances toxiques pendant une période de plusieurs mois.

Le travail soigné de Dratchinski (1) sur l'indol est particulièrement intéressant et démonstratif à ce point de vue. Dratchinski, après avoir éliminé toutes les causes possibles d'erreur, a démontré que l'absorption de 0,04 gramme d'indol par jour (par voie buccale) pendant une période de plusieurs mois, provoque des lésions incontestables dans l'aorte et les autres organes de cobayes.

A côté des corps aromatiques, l'activité des microbes intestinaux se traduit par la production d'autres substances qui passent sans cesse dans la circulation et qui peuvent jouer un rôle très important dans la production de l'artério-sclérose, l'usure et le vieillissement de l'organisme en général.

Sur la proposition du professeur Metchnikoff, nous avons essayé de déterminer si l'acide butyrique, qui est produit plus ou moins constamment dans le tube digestif, joue un rôle quelconque dans la production de la sclérose.

Dans l'étude des différentes maladies et au cours de recherches expérimentales, on a trouvé l'acide butyrique en quantités considérables dans l'organisme humain, soit sous forme d'acide libre, soit en combinaison avec d'autres substances, v. Rubner cité par Schmidt et Strassburger (2) a trouvé que, dans les matières fécales de personnes au régime du pain, 79,2 p. 100 de l'acidité totale sont dus à l'acide butyrique et 20,8 p. 100 à l'acide acétique. Les graisses et les acides gras volatils se trouvent dans le sang, dans la leucémie et dans d'autres conditions pathologiques. D'après van Noorden (3), von Jaksch a trouvé l'acide butyrique dans le sang de malades atteints de cirrhose du foie et Herter (4) a fait une étude assez

(1) DRATCHINSKI, Contribution à l'étude de l'influence de l'indol sur les scléroses. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, juin 1912.

(2) SCHMIDT und STRASSBURGER. *Die Fæces des Menschen*.

(3) VAN NOORDEN. *Handbuch der Path. des Stoffwechsels*, vol. II.

(4) HERTER, *Bacterial Infections of the Digestive Tract.*, 1907.

complète de la fermentation saccharo-butyrique dans les intestins. On trouve cet acide dans les matières fécales de l'homme normal, dans la sueur et les tissus musculaires. Suivant van Noorden, l'urine humaine de vingt-quatre heures contient 60 milligrammes d'acides gras. D'après Hammarsten (1) aussi, l'urine en contient de petites quantités.

Une partie de l'acide butyrique que l'on trouve dans le tube digestif est produite par l'action des ferments digestifs. Le lait contient 4 p. 100 de graisse, dont 4 à 5 p. 100 sont constitués par la tributyrine; le beurre contient 2 p. 100 d'un mélange de graisses et d'acides volatils, qui sont mis en liberté par la lipase du suc pancréatique.

D'autre part, l'acide butyrique est un produit ordinaire de la putréfaction. L'acide se forme non seulement dans les milieux qui contiennent de la graisse et des hydrates de carbone, mais aussi dans les milieux relativement simples auxquels on a ajouté des acides aminés (2).

Parmi les anaérobies qui produisent la plus grande quantité d'acide butyrique, on peut mentionner le *Bacillus butyricus*, *B. Welchii* (*perfringens*), *B. putrificus* et *B. sporogenes* de Metchnikoff, qui, tous, se trouvent plus ou moins fréquemment dans le tube digestif. Quelques-uns de ces microbes paraissent agir directement sur les sucres, tandis que les autres agissent seulement sur de l'acide lactique précédemment formé. Comme l'acide lactique se forme en assez grande quantité pendant la digestion et qu'il peut servir de source d'acide butyrique, la question prend une importance considérable.

A côté de la fermentation d'hydrates de carbone, ces microbes décomposent plus profondément la molécule d'albumine avec la formation d'acides volatils. La réaction acide de l'intestin grêle (acides lactique, butyrique, acétique et succinique) due à la fermentation des graisses, hydrates de carbone, fibrine, cellulose et peut-être de lécithine (3), est maintenue en dépit des sécrétions alcalines qui sont déversées pendant la digestion. Une partie de ces acides est neutralisée aussitôt formée, mais une partie considérable est absorbée et peut, quand elle n'est

(1) HAMMARSTEN, *Lehrbuch für phys. Chim.*, Wiesbaden, 1910.

(2) FROUIN et LEDEBT, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1911, vol I, p. 24.

(3) HERTER, *loc. cit.*

pas brûlée dans le sang, fixer de l'alcali et produire de l'acidose.

Suivant Daunby (1) l'acide butyrique (et l'acide acétique), même en quantités notables, produisent seulement une stimulation locale, et Combe (2) admet « avec la grande majorité des observateurs, que la proportion d'acides gras dérivés de la putréfaction des composés azotés est en trop petite quantité pour causer la moindre intoxication de l'organisme ». Par contre, Herter pense que tous ces acides sont irritants et insiste sur leur faculté d'accaparer les alcalis de l'organisme, quand ils sont absorbés en quantité. Il dit, de plus, que ces acides sont neutralisés par les bases formées pendant la putréfaction intestinale et spécialement par l'ammoniaque, car on trouve le butyrate d'ammoniaque en quantités considérables dans les intestins. Or ce savant croit que ce sel en quantité excessive agit comme un irritant. Brunton et Harley (3) sont du même avis que Herter. Celui-ci trouve que l'acide butyrique est particulièrement irritant lorsqu'il se forme dans l'estomac. Nos expériences confirment cette observation. Harley dit d'ailleurs : « Évidemment, tous ces acides sont absorbés dans la circulation générale et, dans des conditions ordinaires, ils sont assez rapidement oxydés. Dans les cas où ils se sont formés en excès ou lorsque l'absorption par la paroi du tube digestif est excessive, il se peut que les quantités soient trop grandes pour être brûlées dans le sang et, dans ce cas, on les retrouve dans l'urine. Dans ces circonstances, ils peuvent exercer une action toxique. »

Nous avons fait des recherches pour déterminer s'il y avait élimination d'acide butyrique avec l'urine ou les fèces. D'après Herter, l'organisme oxyde les acides volatils très facilement, mais lorsque l'acide butyrique se trouve dans l'urine, c'est sous la forme de sel d'ammoniaque. Même dans le cas où il y aurait une absorption excessive d'acide, tant que le pouvoir oxydant de l'organisme n'est pas diminué, on ne pourrait pas compter trouver une augmentation de l'excrétion d'ammoniaque par l'urine consécutive à cette absorption excessive. Nos expériences ont confirmé cette manière de voir.

(1) DAUNBY, *Alimentary Toxæmias*. *British. med. Jour.*, 25 mars 1913.

(2) COMBE, *Intestinal auto-intoxication*, American edition, 1910.

(3) HARLEY, *The Toxines of the Alimentary Canal*. *Proc. Roy. Soc. Med.*, mars 1913.

Dans une expérience avec le butyrate de calcium (deux doses de 0,225 gramme par la bouche pendant deux jours), l'urine du cobaye en expérience, aussi bien que celle du témoin, étaient acides au tournesol, mais le produit de distillation de l'urine des deux cobayes, après qu'on eût éliminé l'indol, le scatol et le phénol, n'a donné aucune odeur d'éthyl-butyrate après l'addition d'acide sulfurique et d'alcool.

Nous avons fait des expériences sur des cobayes qui recevaient de l'acide butyrique, en quelques cas avec l'urine et les fèces séparément (mais qui ne correspondaient pas à la même période) et aussi avec un mélange des quantités totales d'urine et de fèces excrétées pendant une période donnée. Nous nous sommes servis pour ces expériences de cobayes qui recevaient 0,0044 gramme d'acide par jour. L'urine, dans tous les cas, était alcaline. Dans un seul cas seulement (3 cobayes pendant trois jours), nous avons trouvé l'acide butyrique (éthyl-butyrate dans le distillat). Dans d'autres cas, nous avons trouvé, par la méthode de Duclaux, de l'acide acétique et formique en proportions égales (0,1 gramme p. 100 de chacun); ou encore une partie d'acide valérianique pour vingt parties d'acide acétique.

Dans un cas, le mélange d'urine et de matières fécales nous a donné une partie d'acide butyrique pour dix parties d'acide acétique.

Nous avons fait une expérience avec des fèces seulement (60 grammes recueillis de 14 cobayes pendant trois heures) et nous n'avons pas trouvé d'acide butyrique.

D'après Herter, il n'y a pas de doute que le distillat d'une émulsion du contenu du tube digestif humain normal contient surtout de l'acide acétique et, d'ordinaire, on trouve une quantité modérée d'ammoniaque, en quantité à peu près suffisante pour neutraliser cet acide acétique. Larue et Labbé (1) ont trouvé une quantité moindre d'acides volatils chez les personnes qui sont au régime végétarien et, d'après van Noorden, Langstein et Meyer auraient trouvé que les fèces de malades atteints de catarrhe intestinal contiennent plus d'acides volatils qu'il ne s'en trouve dans les fèces de personnes normales. La présence de plus grandes quantités d'acide acétique paraîtrait indiquer un processus fermentatif d'origine bactérienne dans les intestins.

Malheureusement, nos expériences ont été interrompues avant que nous ayons pu faire des témoins avec des cobayes normaux et n'ont donc pas, par conséquent, de signification spéciale.

De cette brève revue de la formation de l'acide butyrique dans l'organisme, il résulte que cet acide et ses sels peuvent être irritants pour le tube digestif et toxiques, lorsqu'ils sont absorbés en quantité plus ou moins considérable. Par le fait qu'il se produit, de temps en temps, des variations dans la production d'acides et dans l'intensité des phénomènes d'absorption chez chacun de nous, il est difficile de saisir le moment où il s'agit de conditions pathologiques ou normales. Souvent, pendant la durée de la vie, quand la santé, en général,

(1) LARUE et HENRI LABBÉ, L'acidité volatile des matières fécales. *Arch. des maladies de l'appareil digestif*, 1912, p. 329.

paraît bonne, il y a des périodes plus ou moins longues pendant lesquelles, sans être précisément malade, on ne se porte cependant pas très bien. Il se peut que, justement pendant de telles périodes, les effets cumulatifs de cette auto-intoxication se soient produits sur l'organisme, dont le résultat final se manifeste si fréquemment par la sclérose.

Nous allons maintenant considérer nos propres expériences.

Bien que les lésions artérielles spontanées, spécialement celles d'un caractère calcaire, se rencontrent plus souvent parmi les herbivores que parmi les omnivores, nous nous sommes servis du cobaye pour nos expériences.

Il peut y avoir un avantage particulier dans le choix de ces animaux dont les aliments sont riches en sels de chaux, car ils sont spécialement portés à avoir des lésions sclérotiques avec calcification finale.

Selon l'opinion de Loeper et Boveri (1), « cette surcharge calcique est une des raisons de l'extrême facilité avec laquelle on réalise la calcification artérielle (chez le lapin) avec des doses minimales de substances toxiques, tabac, ergotinine, plomb et surtout adrénaline, qui n'ont aucun effet chez le chien et le chat, par exemple ».

Plusieurs savants ont fait des recherches pour déterminer la proportion de cobayes (supposés normaux) qui présentent de l'athérome spontané de l'aorte. Weinberg (2) n'en a pas trouvé un seul cas parmi 236 cobayes examinés.

On peut faire un grand nombre de coupes, même au niveau des valvules et quelquefois ne trouver qu'une petite partie de l'artère présentant des plaques cartilagineuses ou autres lésions caractéristiques. La partie où ces lésions existent peut, par conséquent, très facilement échapper à l'examen.

En étudiant les aortes, nous avons d'habitude fait, dans la région des valvules, des coupes à peu près tous les 2 millimètres, car il nous paraît plus important de faire un grand

(1) LOEPER et BOVERI, La chaux et les artères. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 22 juin 1907, p. 1160.

(2) WEINBERG, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 3 décembre 1908, p. 561.

nombre de coupes à ce niveau que d'en faire quelques-unes seulement dans cette partie, et un petit nombre au hasard dans les autres parties de l'artère.

Dratchinski (1), qui a fait une étude assez complète des aortes de 54 cobayes normaux en a trouvé, en moyenne, 50 p. 100 avec des plaques cartilagineuses. Chez 22 cobayes d'un poids au-dessus de 450 grammes, il a trouvé 99 p. 100 de cartilagination.

Sur nos 12 cobayes témoins qui ont été placés dans les mêmes conditions que nos animaux d'expérience, il a fallu en éliminer trois, pour diverses causes.

Les cobayes pesaient en moyenne 560 grammes. Tous ont été chloroformés, la stérilité du sang du cœur vérifiée. Les frottis de leurs organes, qui étaient macroscopiquement normaux, ne montraient pas de micro-organismes. Ce sont les conditions que nous nous sommes imposées dans nos expériences. Sur ces 9 cobayes, nous en avons trouvé 4 avec plaques cartilagineuses nettes, et 1 dont le commencement de cartilagination était évident.

Aucun de ces animaux ne montrait de dépôts calcaires ni dans l'aorte, ni dans les autres organes. A noter que, dans le cas de notre plus lourd cobaye (735 grammes) tous les organes paraissaient parfaitement normaux. Nos résultats nous ont donné une proportion d'au moins 50 p. 100. Tout en admettant que le nombre de cobayes est trop petit pour fonder une opinion sur la proportion de cobayes dans lesquels on trouve des lésions sclérotiques de l'aorte, nous croyons, en comparant nos résultats à ceux de Dratchinski, qu'au moins 50 p. 100 des cobayes d'un poids au-dessus de 350 grammes présentent l'athérome spontanée de l'aorte.

Comme l'acide butyrique est un fort irritant, et étant donné que dans nos expériences nous nous étions proposé de voir s'il était possible de produire une intoxication chronique, nous devons, vu l'action véritable de l'acide butyrique, déterminer une dose à donner qui ne provoquerait chez nos animaux aucune manifestation visible de malaise ou d'empoisonnement.

(1) DRATCHINSKI, *loc. cit.*

Le tableau suivant résume les expériences faites pour déterminer cette dose :

Cobaye	Poids	Dose (grammes)	Dose (cent. cube)	Survie	Perte de poids	Mode d'injection	
3	630	0.088	1 »	2 h 1/2.	»	Péritoine.	Congestion d'organes et intestins. Liquide sanguinolent dans le péritoine.
4	520	0.044	0.5	4 h. 1/2.	»	—	Comme le n° 3. — La vessie et les intestins contiennent du sang.
5	400	—	—	23 heures.	»	—	Organes, comme les n°s 3 et 4. — Intestins très congestionnés.
6	380	—	—	36 heures.	40 gr.	Bouche.	Comme le n° 5. — Liquide sanguinolent dans l'estomac.
7	420	—	—	3 jours.	35 gr.	Sonde.	Foie brûlé. Estomac brûlé et ulcéré. Poumons congestionnés.
8	500	0.07	(1)	4 jours.	70 gr.	—	Inflammation de l'estomac et des intestins. Poumons congestionnés.
9	480	0.088	1 »	20 heures.	»	—	Tous les organes très brûlés.

(1) Il est très probable que le n° 8 a rejeté une partie de sa dose.

Dans tous les cas il y avait de la dyspnée, de l'hypothermie et les mouvements du cœur étaient ralentis.

Comme nous supposons que l'acide, ingéré en petite quantité, serait promptement neutralisé, et comme nous voulions donner une dose dont une partie, au moins, passerait dans la circulation, nous avons commencé nos expériences avec une dose de 1 cent. cube (0,011 gramme) d'acide par jour, en solution 1/8 normale. Nous avons injecté cette quantité à l'aide de la sonde dans l'estomac à six cobayes et une quantité double à une autre série de six cobayes.

Mais dans les deux séries la dose s'est montrée être trop forte. En moins d'un mois plusieurs animaux étaient morts et les autres étaient si maigres qu'il a fallu rejeter tous ces cobayes et recommencer une nouvelle série.

A l'autopsie, dans la plupart des cas, il y avait une ulcération ou une inflammation de l'estomac, une congestion plus ou

moins sévère des poumons et, en général, un état hémorragique de l'intestin grêle.

Dans toutes nos autres expériences nous avons introduit l'acide dans la bouche à l'aide d'une seringue et avec les précautions nécessaires.

Dans la série suivante (série A) nous avons dilué la solution de façon que 1 cent. cube contint 0,0011 gramme d'acide, et nous avons donné cette dose chaque jour, à dix-sept cobayes. Une autre série (série B) de douze cobayes a reçu une dose double, soit : 0,0022 gramme d'acide. Après un mois, comme les cobayes paraissaient bien supporter ces doses et comme la quantité d'acide nous semblait très petite, nous avons doublé la dose de chaque série en donnant la même quantité de liquide. Comme les cobayes de la série B (2 c. c. = 0,0044 gramme) ont commencé bientôt à maigrir, nous avons dû au bout d'un mois revenir pour les deux séries à la dose primitive.

Ne pouvant donner que de très petites quantités d'acide libre, nous avons décidé de donner un sel d'acide butyrique, espérant de cette façon pouvoir donner une quantité beaucoup plus grande. Comme on le verra, nous avons pu, en effet, donner sous cette forme vingt-trois fois plus d'acide qu'à la série B et quarante-six fois plus qu'à la série A.

Morel (1) a montré que les butyrates et les autres sels de calcium des acides gras volatils étaient plus toxiques que les sels minéraux de calcium. De plus, le butyrate de calcium était plus toxique que les butyrates des corps monovalents.

D'après lui, les carnivores sont trois fois plus sensibles à ces sels que les herbivores. Il a trouvé que, pour le cobaye, la dose mortelle de butyrate de chaux, en injection péritonéale, était de 0,4 gramme par kilogramme d'animal, ou de 0,1 gramme pour un cobaye de 250 grammes (butyrate de Ca, à 5 p. 100 dans l'eau physiologique.)

Nous avons décidé de nous servir de ce sel dans nos expériences, car il nous semblait que, s'il y avait une tendance à la production de lésions de sclérose et spécialement de dépôts calcaires dans l'aorte par l'acide butyrique en doses très faibles, la présence dans l'organisme de calcium en excès concourrait

(1) MOREL, Recherches sur les propriétés biologiques des sels de calcium, des acides gras saturés. *Journ. Phy. et Path. générale*, mai 1912, p. 453.

à faciliter cette production. Loeper et Boveri (1) avaient déjà montré qu'en donnant des sels de chaux en même temps que des doses très faibles d'adrénaline, des lésions étendues se produisaient dans l'aorte des lapins, pendant que les témoins qui n'avaient reçu que de l'adrénaline étaient absolument indemnes. Ils ont fait aussi la contre-épreuve, en donnant une dose d'adrénaline toxique à des lapins au régime normal et en prenant comme témoins des lapins dont le régime contenait peu de chaux (pommes de terre, carottes, son). Ils ont trouvé des dépôts calcaires seulement dans l'aorte des lapins au régime normal. Ces savants ont conclu de leurs expériences que « la surcharge calcique, en effet, ne crée pas la pétrification artérielle, mais elle en facilite singulièrement la production et en augmente l'étendue ».

Dans ses expériences, Ott (2) ajoutait du phosphate de calcium aux substances irritantes employées, en même temps qu'il châtrait (3) ses animaux afin de faciliter la production de lésions artérielles.

Comme témoins de notre expérience avec le butyrate de chaux, nous donnons actuellement à une autre série d'animaux la même quantité d'acide sous forme de sel de sodium. Nos résultats seront communiqués plus tard.

Le tableau ci-dessous résume d'autres expériences faites pour

COBAYE	POIDS	DOSE (grammes)	MODE d'injection	SURVIE	
1	345	0.25	Sonde.	Rétabli.	Hypothermie. Rétabli au bout de 4 jours. Perte : 20 grammes.
2	300	0.375	—	30 heures.	Dyspnée. Estomac normal. Intestins un peu irrités.
3	260	0.5	—	47 heures	Dyspnée. Poumons très congestionnés. Intestins très hémorragiques.
4	420	0.475	Péritoine.	2 h. 4/4	Températ. tombée de 2 degrés. Dyspnée. Viscères très hémorragiques.

(1) LOEPER et BOVERI, *loc. cit.*

(2) OTT, L'arterio-sclérose gastrica ed intestinale. *Tesi de libera Docenza*, Sassari, 1910.

(3) WEINBERG et VAILLARD, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1908, ont trouvé que l'athérome des artères de chevaux châtrés n'est pas aussi fréquente que dans le cas de chevaux entiers.

déterminer la dose de butyrate de Ca que l'on peut donner, sans produire de signes visibles d'empoisonnement. Nous nous sommes servi d'une solution à 12,5 p. 100 dans de l'eau distillée (pour l'injection intrapéritonéale, dans de l'eau physiologique).

La dose donnée au n° 4 est la dose mortelle de Morel.

A la suite de ces expériences, nous avons décidé de donner à nos cobayes (série C), par la bouche, tous les jours, 0,5 cent. cube d'une solution à 12,5 p. 100 (soit 0,0625 gramme) de butyrate. Pendant ces expériences, les animaux sont restés en bonne condition et ont gagné en poids comme les témoins.

Comme nous l'avons déjà dit, seuls les animaux dont le sang et les organes étaient stériles et dans lesquels il n'y avait pas d'anomalies d'un caractère anatomo-pathologique, ont été pris en considération.

Dans aucun cas, nous n'avons trouvé de lésions macroscopiques de l'aorte.

Nous nous sommes servi de la technique usuelle pour la préparation et la coloration des coupes. Comme matières colorantes nous avons employé généralement l'hématéine-éosine et la méthode de van Gieson, et, pour les fibres élastiques, le colorant de Weigert. Pour l'examen de l'aorte abdominale, nous avons trouvé la méthode suivante très commode. L'aorte, de la crosse jusqu'aux branches des artères fémorales, est fendue avec des ciseaux et roulée autour d'un objet cylindrique quelconque.

On la lie avec un fil, on dégage l'objet cylindrique central et on fixe. Une seule coupe, faite dans le sens longitudinal de l'artère, dans la partie centrale de ce rouleau, montrera la plus grande partie de l'aorte thoracique et abdominale (pl. III, fig. 4).

Pour diverses causes nous n'avons pu prendre en considération pour nos résultats que cinq cobayes dans la série A, cinq dans la série B, et huit dans la série C. Tous ces animaux ont survécu jusqu'à la fin de l'expérience et ont été chloroformés ou saignés à blanc.

Le tableau ci-dessous contient un résumé de nos expériences avec le résultat de l'examen histologique des organes.

SÉRIE	A		NUMÉRO	POIDS INITIAL	POIDS FINAL	DURÉE de l'expérience (en semaines)	ACIDE TOTAL ou BUTYRATE INJECTÉ	AORTE cartilaginisation nette	AUTRES LÉSIONS dans l'aorte	SCLÉROSE au début	REIN (lésions)	DÉPÔTS CALCAIRES (rein)	FOIE (lésions)	OBSERVATIONS
	1 c. c. = 0,0041 gr. acide.													
A	16	240	320	12	0,132	+	+	+	+	+	+	+	+	(1)
	17	333	470	16	0,165	—	+	+	+	+	+	—	»	
	18	280	570	29 1/2	0,243	—	+	+	+	+	+	+	»	
	64	240	480	29	0,25	—	+	+	+	+	+	—	»	
	65	230	470	25 1/2	0,21	—	»	+	+	+	+	+	»	
B	14	253	360	12	0,266	—	+	+	+	+	+	»	»	
	49	245	600	24	0,35	+	+	+	»	+	+	+	+	
	51	225	480	17	0,31	+	+	+	»	+	—	—	+	
	52	230	530	24	0,35	—	—	»	»	—	—	—	—	
	54	280	590	26	0,38	+	+	»	+	+	+	+	+	
C	1	300	505	22	9,1	—	+	+	+	+	+	+	+	(3)
	2	305	395	22	9,1	+	+	+	»	+	+	+	+	
	3	245	610	21	8,6	+	»	»	»	+	+	+	+	
	4	320	475	13	5 »	—	+	»	»	—	—	—	+	
	5	295	570	20 1/2	8,5	+	+	+	»	+	+	+	+	
	6	280	470	19	7,75	—	+	+	»	+	+	+	+	
	9	290	560	19 1/2	8 »	+	+	+	»	+	+	+	+	
	10	290	435	16 1/2	6,56	—	+	+	+	+	+	+	+	

(1) Dégénérescence et hémorragie.
(2) 0,0625 gramme de butyrate de Ca correspond à 0,052 gramme d'acide butyrique.
(3) Une partie de trachée calcifiée.

Les autres lésions dans l'aorte consistaient souvent en dégénérescence grasseuse.

Deux cobayes de la série A, deux de la série B et cinq de la série C, montraient des lésions pour la plupart peu marquées de la rate.

L'étude histologique de nos coupes nous a donné les résultats suivants :

Aorte. — Nous dirons d'abord que chez aucun de nos cobayes, nous n'avons constaté de dépôts calcaires dans l'aorte, bien que dans 55 p. 100 de nos cas, nous ayons rencontré de tels dépôts dans, ou entre les tubes du rein ; et une fois, une grande partie d'une coupe de trachée que nous avons coupée par hasard avec l'aorte, a montré de la calcification. Dratchinski a trouvé que presque toujours ces dépôts calcaires dans les reins de ses cobayes coïncidaient avec la calcification des artères. L'absence de la calcification de l'aorte n'exclut pas nécessairement une sclérose même assez généralisée. Nous sommes du même avis quant à l'absence de la cartilagination en foyers circonscrits. De l'étude de nos coupes, il paraît résulter que, dans la plupart des cas, ces foyers cartilagineux se sont développés après que les viscères, surtout le rein, ont présenté un état plus ou moins scléreux. En parlant des organes, Josué, (1) dit que « pendant qu'il existe des cas où la sclérose est manifestement causée par les lésions artério-scléreuses des artères il en est d'autres au contraire, où les altérations artérielles et les lésions scléreuses se sont produites simultanément ».

On a très rarement trouvé des foyers cartilagineux sans lésions d'autres organes. Au contraire, dans beaucoup de nos cobayes, nous avons trouvé de la sclérose avancée des organes sans la moindre trace de cartilagination dans l'aorte.

Comme les plaques cartilagineuses de l'aorte sont généralement accompagnées d'autres lésions d'artères ou d'organes, il est probable qu'elles représentent des lésions postérieures aux lésions viscérales ou bien témoignent d'une irritation particulièrement intense de l'aorte, dans le cas où elles apparaissent simultanément avec celles-ci.

D'ordinaire, alors qu'il y avait de la sclérose marquée des

(1) O. Josué, *Traité de la Sclérose*. Paris, 1909.

organes et en absence de cellules cartilagineuses, nous avons trouvé que, dans l'aorte ascendante ainsi que dans l'aorte abdominale ou thoracique, les cellules musculaires avaient subi une dégénérescence graisseuse. Ces cellules sont fréquemment altérées, le protoplasma est creusé de vacuoles rondes qui sont souvent périnucléaires. Josué et surtout Klotz (1) ont discuté cette forme de dégénérescence. Celui-ci croit que c'est un des modes principaux de la production de la calcification. Quelquefois, nous voyons que le tissu musculaire ne conserve plus sa forme compacte usuelle : il est creusé de larges espaces remplis d'une substance séreuse. On considère que ceci est dû à un œdème local de la tunique musculaire. Dans des cas où nous n'avons pu constater des cellules cartilagineuses nettes, nous avons trouvé dans ces espaces (généralement dans l'aorte ascendante), des cellules musculaires ou conjonctives dégénérées, qui présentaient çà et là l'aspect hyalin de cellules cartilagineuses. Souvent, il y a un épaississement diffus de cette partie de l'aorte.

Dans quelques cas, assez rares d'ailleurs, nous avons trouvé de petits anévrysmes et quelquefois une oblitération presque complète de la lumière des *vasa vasorum* qui passent dans l'adventice.

Quelquefois aussi, les fibres élastiques sont déplissées ; elles paraissent tendues et, avec un fort grossissement, montrent un commencement de dégénérescence. D'après Manouélian (2), « la calcification est un mode de dégénérescence des fibres élastiques ». Nous mentionnons tous ces changements de l'aorte, parce que, si l'on considère le résumé donné ci-dessus seulement au point de vue de la présence ou de l'absence de foyers cartilagineux ou calcaires, on pourrait très bien se tromper quant aux lésions actuellement présentes dans les aortes de nos cobayes.

Il se peut très bien que l'acide butyrique et ses sels ne produisent d'eux-mêmes que de la sclérose. C'est ainsi que d'après Boveri (3), la syphilis n'engendre que de la sclérose et

(1) P. KLOTZ, *Jour. Exp. Medicine*. Vol. VIII, n° 2, mars 26.

(2) MANOUELIAN, Recherche sur l'athérome aortique. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVII, janvier 1913.

(3) BOVERI, Lésions aortiques d'origine syphilitique chez le singe. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. XXV, 1913, n° 27, p. 102.

que d'autres causes, agissant sur ce terrain syphilitique, peuvent donner lieu au développement d'athéromes.

En général, toutes les lésions décrites se rencontrent moins fréquemment dans les aortes des séries A et B (que les organes soient lésés ou non), que dans les aortes de la série C. Si l'on avait pu donner aux séries A et B l'acide en plus grande quantité ou peut-être pendant une plus longue période, il est possible qu'on ait pu produire chez ces cobayes une condition sclérotique aussi avancée que celle des cobayes de la série C, à laquelle nous avons donné de 23 à 46 fois plus d'acide, sous la forme de sel de calcium.

Rein. — On voit dans les coupes du rein tous les stades de sclérose. Très souvent, il y a une infiltration de mononucléaires et surtout de cellules conjonctives néoformées autour des glomérules et des vaisseaux. Les glomérules eux-mêmes sont pour la plupart respectés, mais quelquefois on les trouve rétractés et contenant des vacuoles dues au dépôt de graisse.

Cette dégénérescence graisseuse s'observe aussi dans le parenchyme de la substance corticale. Très souvent, on trouve des foyers fortement hémorragiques. La prolifération de tissu conjonctif autour des glomérules n'est pas très fréquente, mais ce tissu prolifère fortement autour des artérioles, envoyant des prolongements très épais dans le parenchyme voisin (pl. III, fig. 3). Ça et là, loin des artères visibles dans les coupes, on trouve de grosses plaques de tissu conjonctif. Il paraît, dans ces cas, que la sclérose est consécutive aux lésions dégénératives de certaines parties du rein, et que ces plaques représentent des cicatrices ou un remplissage du tissu rénal dégénéré (pl. III, fig. 3).

Nous avons déjà parlé des dépôts calcaires dans ou entre les tubes. Ils se sont rencontrés dans 75 p. 100 des cas de la série C et dans 40 p. 100 de ceux des séries A et B. Nous avons trouvé ces petits dépôts calcaires dans les reins de deux cobayes de la série A et de deux cobayes de la série C, dont les aortes ne montraient pas de cellules cartilagineuses. Nous avons également vu un épaississement des petites artérioles du rein dans plusieurs de nos coupes.

Foie. — Les lésions du foie sont caractérisées surtout par la dégénérescence graisseuse du parenchyme, par des hémorragies, soit en grands foyers, soit plus ou moins généralisées, ainsi que par la prolifération de tissu conjonctif autour des canaux biliaires et des vaisseaux sanguins. Souvent, il y a des parties où il ne reste presque plus de protoplasme de cellules hépatiques dont les noyaux se colorent mal ou pas du tout (pl. III, fig. 4). Le foie est généralement lésé autant ou plus que le rein dans les cas où l'on rencontre des lésions dans les deux organes. Très souvent, lorsque le rein et le foie accusent un état de sclérose assez avancé, nous n'avons pas rencontré de foyers cartilagineux dans l'aorte. Il est intéressant à noter que, après l'ingestion de doses mortelles d'acide, les lésions les plus notables du foie ont été caractérisées par l'hémorragie diffuse et une nécrose généralisée.

Dans la plupart des cas, les capsules surrénales et la rate ont été peu lésées.

Nous pouvons constater qu'en général les lésions que nous avons trouvées dans les organes de nos cobayes ne diffèrent de celles qui se rencontrent dans les cas de sclérose spontanée du cobaye que par leur degré d'intensité.

Séries A et B. — Dans ces séries il y a eu 40 p. 100 de cartilagination. Même dans les cas où il y avait de l'athérome (par athérome nous entendons seulement les *grosses lésions* des grandes artères caractérisées par des foyers cartilagineux ou des dépôts calcaires) ou des lésions caractéristiques de la sclérose commençante de l'aorte, il nous a paru que les lésions des organes étaient un peu plus marquées que dans les cas de nos témoins dans les mêmes conditions. Nous ne voulons pas insister sur l'effet de l'acide que nous avons pu donner à ces deux séries. Il est tout à fait possible qu'une grande partie de l'acide ingéré (généralement à jeun) ait été neutralisée dans l'intestin et n'ait pas passé dans la circulation générale. Mais, du fait que nous avons trouvé des dépôts calcaires dans les reins de deux cobayes dont les aortes n'ont pas montré d'athérome (nous n'avons jamais constaté ce fait dans la sclérose spontanée du cobaye), et que nous avons rencontré les cellules cartilagineuses plus souvent dans les aortes de la série B que

dans celles de la série A, dont les cobayes ont reçu moins d'acide, nous sommes porté à croire que l'introduction de l'acide butyrique libre dans le tube digestif a contribué, jusqu'à un certain point, à la production des lésions observées.

Il se peut que, parmi les cobayes, il y ait des individus qui, pour diverses causes physiologiques, ou à cause de leur régime, aient une prédisposition à la sclérose, mais chez lesquels elle ne se soit pas encore développée.

Dans ces conditions, l'acide butyrique qui, par lui-même, ne serait pas toxique aux doses données, pourrait faciliter la production de sclérose chez ces individus (1).

Série C. — Dans la série C, sans aucun doute, les cobayes dont l'aorte ne présentait pas d'athérome, les lésions des organes dénotaient un état de sclérose beaucoup plus avancée que ne le montraient les témoins dans les mêmes conditions. Bien que nous n'ayons trouvé de la cartilagination de l'aorte que dans 50 p. 100 des cas, nous considérons qu'au moins 90 p. 100 des cobayes de cette série étaient sclérotiques.

CONCLUSIONS.

Vu les faibles quantités d'acide supportées par nos animaux, vu aussi le nombre restreint que nous avons pu étudier, et en tenant compte surtout du fait que la sclérose spontanée, avec ou sans athérome, se rencontre chez une grande proportion (jusqu'à 90 p. 100 dans certains lots) de cobayes normaux, nous ne nous croyons pas autorisé à tirer une conclusion définitive de nos recherches sur l'action de l'acide butyrique libre.

En revanche, nous croyons que l'ingestion d'acide butyrique sous la forme du sel de calcium, aux doses que nous avons données, provoque, dans l'aorte et les autres organes des cobayes, la sclérose généralisée, mais non l'athérome proprement dit. Cependant, pour les raisons que nous venons de

(1) Orr (*loc. cit.*) a montré que l'irritation locale d'un organe pendant une longue période peut produire la sclérose des vaisseaux relatifs à cet organe.

mentionner ci-dessus, cette conclusion doit être acceptée sous réserves.

En terminant ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements à M. le professeur Metchnikoff pour le sujet de recherches qu'il a bien voulu nous proposer et pour l'accueil qu'il nous a fait dans son laboratoire.

EXPLICATION DE LA PLANCHE III

FIG. 1. — *Aorte*. La plus grande partie de l'aorte thoracique et abdominale dans une seule coupe. G = 40/1.

FIG. 2. — *Foie*. Cobaye 9. Série C. Forte prolifération de tissu fibreux riche en cellules embryonnaires et mononucléaires. Commencement de dégénérescence grasseuse autour du canal biliaire. G = 250/1.

FIG. 3. — *Rein*. Cobaye 1. Série C. Sclérose assez avancée. Prolifération de tissu conjonctif aux dépens du parenchyme rénal. Foyer de mononucléaires englobés par le tissu scléreux. G = 60/1.

FIG. 4. — *Foie*. Cobaye 54. Série B. Tissu hépatique nécrosé avec dégénérescence hyaline du tissu conjonctif. Hémorragie généralisée. Avec un plus fort grossissement on pouvait voir des restes de cellules hépatiques et conjonctives dégénérées. G = 80/1.

FIG. 5. — *Rein*. Cobaye 3. Série C. Sclérose au début de la substance corticale. G = 250/1.

FIG. 6. — *Foie*. Cobaye 9. Série C. Prolifération de tissu conjonctif consécutive à la phase primaire de cirrhose. G = 60/1.

FIG. 7. — *Rein*. Cobaye 54. Série C. Dépôts calcaires dans et entre les tubes. Hémorragie diffuse. Tissu conjonctif contenant un foyer de cellules embryonnaires. G = 60/1.

L'INFLUENCE DES ACIDES SUR L'ACTIVITÉ DE LA MALTASE DIALYSÉE

par W. KOPACZEWSKI.

Au cours de nos recherches sur la dialyse de la maltase [1], nous avons constaté que la dialyse enlève à la maltase de Kôji (takadiastase du commerce) 94,5 p. 100 de ses matières solides et 74,4 p. 100 de ses cendres. Nous avons pensé que, lorsqu'on étudie l'activité de la maltase en présence des acides, il était probable qu'une si grande quantité d'impuretés devait avoir une certaine influence sur les quantités optimales des acides à employer. Il fallait donc, pour préciser les conditions exactes de l'activité diastasique, chercher un moyen de rendre négligeables les impuretés qui accompagnent toujours les préparations des diastases.

G. Bertrand et ses élèves [2] ont cherché à réaliser ce problème : 1° par la pureté des préparations ; 2° en employant de très petites doses de diastases pauvres en cendres et très actives, et 3° en vérifiant avec des solutions diastasiques bouillies, ajoutées au lieu de l'eau, si l'influence d'impuretés est encore notable.

Nous avons pensé qu'on pourrait atteindre le même but en dialysant les solutions diastasiques brutes du commerce.

Il était surtout intéressant de voir si les différences établies par nous [3] pour certains acides entre leurs propriétés actives pour la maltase et leurs propriétés physico-chimiques (hydrolyse des sucres, conductivité spécifique) persistent lorsqu'ils agissent sur la maltase dialysée ; en d'autres termes, si l'activité de la maltase dépend exclusivement des concentrations en ions H, ou bien si d'autres facteurs interviennent aussi.

La maltase et le maltose ont été les mêmes que dans nos travaux sur la dialyse de la maltase [4].

La dialyse était effectuée comme dans nos recherches précédentes ; toutefois, au lieu du dispositif ordinaire, nous nous

sommes servi de notre dialyseur analytique [5] et nous avons dialysé pendant 72 heures. La solution de maltase dialysée était neutre vis-à-vis de l'héliantine; elle contenait 1,0 p. 100 des cendres; sa conductivité électrique était $K = 9,5 \times 10^{-6}$.

La marche des expériences était la suivante : d'un certain

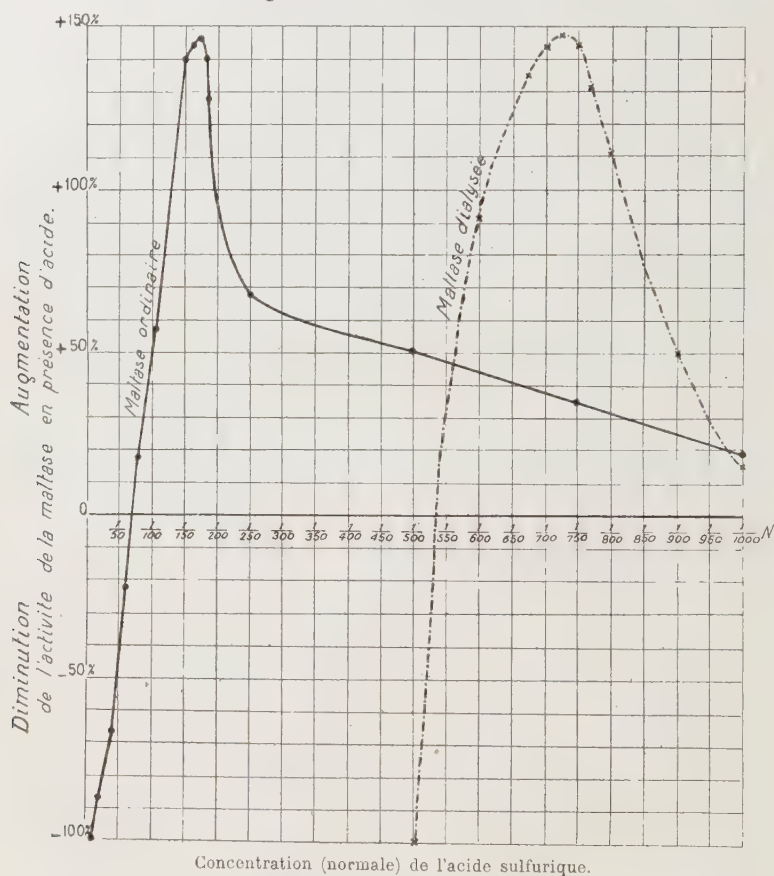


FIG. — Influence de l'acide sulfurique sur l'action de la maltase ordinaire ou dialysée.

nombre de tubes à essai en verre d'Iena, préalablement nettoyés pendant 15 minutes à la vapeur d'eau, quelques-uns étaient remplis avec 2 cent. cubes d'eau pure ($K = 1,5$ à $2,0 \times 10^{-6}$), les autres avec le même volume d'acide à différentes concentrations. Ces tubes, ainsi que les solutions de maltase dialysée et fraîchement préparée et de maltose, ont été

placés dans l'étuve à $+ 37$ degrés $\pm 0,5$ degré centigrade et laissés pendant 30 minutes. Après ce temps, on mélangeait la solution sucrée avec chacune des solutions diastasiques et on versait dans chaque tube à essai 3 cent. cubes du mélange. On a expérimenté sans vérifier l'hydrolyse du sucre par la dose la plus forte d'acide [6], et sans antiseptique [7]. Après 3 h. $1/2$, on a retiré les tubes de l'étuve et on a arrêté l'hydrolyse en ajoutant de la soude caustique jusqu'au virage rouge de la phtaléine du phénol. Les sucres ont été dosés par la méthode de G. Bertrand.

Les solutions d'acide ont été titrées en présence de phénol-phtaléine. Chaque acide était étudié en deux ou trois séries afin de préciser la dose en présence de laquelle la maltase possède son optimum d'activité. Les acides employés étaient les produits « chimiquement purs » du commerce. Les concentrations finales de la maltase et du maltose étaient respectivement de 1 p. 100 et 2 p. 100.

Le tableau I montre la marche générale des expériences pour l'acide sulfurique.

TABLEAU I.

CONCENTRATION en ACIDE SULFURIQUE	MALTASE ORDINAIRE			MALTASE DIALYSÉE		
	I ^{re} série.	II ^e série.	III ^e série.	I ^{re} série.	II ^e série.	III ^e série.
1/10 N	— 100,0	— 100,0		
1/20 N	— 87,2	— 100,0		
1/40 N	— 66,4	— 68,0	— 100,0		
1/60 N	— 22,4			
1/80 N	+ 17,2			
1/100 N	+ 58,4	+ 58,2	— 100,0		
1/150 N	+ 140,2	+ 138,8			
1/160 N	+ 144,4			
1/170 N	+ 146,0			
1/180 N	+ 140,0			
1/190 N	+ 128,2			
1/250 N	+ 68,4	— 100,0	— 100,0	
1/500 N	+ 51,7	— 100,0	— 100,0	
1/600 N	+ 92,8	
1/700 N	+ 143,5	+ 147,3
1/725 N	+ 147,5
1/750 N	+ 36,4	+ 144,0	+ 143,7	+ 143,7
1/775 N	+ 131,2
1/800 N	+ 110,0	+ 108,6
1/900 N	+ 50,0	
1/1000 N	+ 18,4	+ 15,4	
1/2250 N	0	0	

Les chiffres indiqués représentent l'augmentation (+) ou la diminution (—) du pouvoir hydrolysant de la maltase en présence de l'acide; par le zéro nous entendons les doses sans aucune action sur l'hydrolyse.

En construisant une courbe, on peut constater que l'activité de la maltase dialysée en présence d'acide sulfurique est beaucoup plus régulière que dans le cas de maltase non dialysée (fig. 4).

Comme on le voit, la solution non dialysée présente son activité maximale dans un milieu d'une acidité 1/170 N; tandis que, pour la solution dialysée, l'activité maximale en présence d'une concentration de 1/725 N.

Il en est de même en général. L'optimum de l'activité est atteint, dans le cas de maltase dialysée, avec des doses d'acide inférieures à celles qui sont nécessaires à l'activation de la maltase non dialysée 1). C'est ce que montre le tableau II, qui donne

TABLEAU II.

ACIDES	CONCENTRATIONS OPTIMALES POUR LA MALTASE	
	Non dialysée.	Dialysée.
Chlorhydrique	1/160 N	1/600 N
Sulfurique	1/170 N	1/725 N
Phosphorique	1/25 N	1/125 N
Formique	1/60 N	1/125 N
Acétique	1/35 N	1/50 N
Monochloracétique	1/150 N	1/200 N
Dichloracétique	1/200 N	1/500 N
Trichloracétique	1/250 N	1/625 N
Propionique	1/20 N	1/25 N
Butyrique normal	1/10 N	1/60 N
Oxalique	1/150 N	1/650 N

les résultats obtenus avec les acides, présentant le maximum des différences entre leurs propriétés physico-chimiques et leurs influences sur l'activité de la maltase, et choisis parmi les 62 acides précédemment étudiés par nous [3].

En prenant l'acide chlorhydrique comme base des calculs et

(1) Étant donné que les solutions de maltase subissent une dilution pendant la dialyse, on a toujours opéré avec des solutions plus fortes.

en rangeant les autres acides suivant leur activité, nous verrons que, pour tous les acides étudiés, les différences entre leurs propriétés physico-chimiques et leur influence sur le pouvoir hydrolysant de la maltase dialysée sont les mêmes que pour la maltase non dialysée (voir le tableau III).

TABLEAU III.

ACIDES	POIDS moléculaire.	ACTIVITÉ DES ACIDES (HCl = 100) vis-à-vis de la maltase.		ACTIVITÉ des acides (HCl = 100) vis-à-vis du saccharose. [8]	CONDUCTIVITÉ spécifique des acides (HCl = 100.)
		Ordinaire.	Dialysée.		
Chlorhydrique	36,5	100 »	100 »	100 »	100 »
Sulfurique	98,0	106,2	120,8	53,6	65,1
Phosphorique	98,0	15,6	20,8	6,23	7,3
Formique	46,0	37,5	20,0	1,53	—
Acétique	60,0	21,8	5,8	0,40	1,4
Monochloracétique	94,5	93,7	33,3	4,84	4,9
Dichloracétique	129,0	125,0	83,3	27,1	25,3
Trichloracétique	163,5	156,2	104,2	75,4	62,3
Propionique	74,0	12,5	4,1	—	—
Butyrique	88,0	6,2	1,7	—	—
Oxalique	90,0	92,5	108,3	18,6	19,7

Si on calcule, suivant la formule

$$[H] = \sqrt{K} \times C$$

(K est la constante de dissociation et C représente la concentration moléculaire de l'acide en question), les concentrations en H. pour les doses optimales des acides étudiés, calculs rendus possibles grâce à l'élimination des différents sels, on constate que $P_H = \log [H.] = 3,6$ à $5,8$, suivant la nature de l'acide employé [9] (voir le tableau IV).

Tout dernièrement, Michaelis et Rona [10], en faisant varier les concentrations ioniques au moyen des acétates ou des phosphates, ont trouvé comme optimum d'activité de la maltase non dialysée une concentration en ions acides correspondant à $P_H = 6,1$ à $6,8$.

Le chiffre obtenu par ces auteurs est assez rapproché du nôtre pour l'acide acétique, mais diffère de ceux pour les autres acides.

Si nous comparons les résultats obtenus par de nombreux auteurs au sujet de l'influence des acides sur de multiples phénomènes biologiques, nous pouvons constater que, dans chaque cas, les acides se rangent d'après leur activité d'une façon toute spéciale; jamais aucun parallélisme ne pouvait être constaté entre le degré de dissociation électrolytique et l'activité catalytique. Donc il y a là un facteur inconnu qui intervient et qui trouble les résultats observés.

TABLEAU IV.

ACIDES	CONCENTRATIONS EN IONS H. POUR LA MALTASE		CONCENTRATIONS OPTIMALES POUR LA MALTASE	
	Non dialysée.	Dialysée.	Non dialysée.	Dialysée.
Formique.	$2,5 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$	1/60 N	1/125 N
Acétique	$1,2 \times 10^{-4}$	$8,4 \times 10^{-5}$	1/35 N	1/50 N
Monochloracétique.	$2,6 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-4}$	1/150 N	1/200 N
Dichloracétique	$1,1 \times 10^{-3}$	$4,5 \times 10^{-4}$	1/200 N	1/500 N
Trichloracétique	$4,4 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-3}$	1/250 N	1/625 N
Propionique	$1,8 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-4}$	1/20 N	1/25 N
Butyrique	$3,8 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{-4}$	1/10 N	1/10 N
Oxalique	$2,2 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-4}$		

Quel est ce facteur?

Du côté purement physico-chimique, la théorie de la classification de l'activité catalytique des acides, suivant le degré de dissociation, a subi, ces temps derniers, des atteintes considérables.

Traube, dans ses nombreux travaux, suppose que ce n'est pas la constante de dissociation qui est la cause primaire de la force catalytique des acides, mais la force de liaison entre la molécule dissoute et la molécule dissolvante (Haftdruck); cette opinion est soutenue également par Fouard.

D'autre part, les travaux d'une grande importance de Goldschmidt, Acree, Snethlage, Taylor, Bredig et ses élèves, ont établi que, dans les réactions catalytiques par les acides, ce n'est pas la partie dissociée qui possède l'influence capitale et que la partie non dissociée joue un rôle très important; en plus cette partie non dissociée, dans le cas des acides forts,

peut avoir une force catalytique deux ou trois fois plus grande que la partie correspondante des ions H. libres.

Finalement, les chiffres obtenus par G. Bertrand et ses élèves [11] avec la sucrase montrent à l'évidence qu'on peut déceler une différence entre les acides, même dans les cas où les concentrations sont au-dessus de celles d'une dissociation électrolytique totale (par exemple M/12.000 ou M/13.000). G. Bertrand conclut donc que les anions interviennent aussi dans les réactions (4).

Quels sont donc les facteurs qui interviennent dans les phénomènes biologiques, provoqués par les acides? — les anions, la force de liaison entre les molécules dissolvante et dissoute, ou bien la nature des anions? — il est impossible de répondre actuellement.

Une chose est certaine, c'est que l'activité des acides dans les phénomènes biologiques ne pourrait être expliquée uniquement par le degré de leur dissociation électrolytique.

De l'ensemble de ces faits nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° L'influence des acides sur l'action de la maltase ne s'explique pas exclusivement par la concentration en ions acides; la nature des acides mêmes est un facteur non négligeable. Ces faits, d'ailleurs, sont en conformité avec ceux observés sur les autres diastases : sucrase et peroxy-diastrase, ainsi que sur les différents phénomènes biologiques.

2° Pour bien préciser le conditions d'activité de la maltase, il faut opérer avec des solutions dialysées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KOPACZEWSKI. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVII, 1913, p. 523.
- [2] G. BERTRAND et M. et M^{me} ROSENBLATT. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, 1912, p. 321 et 932.
- [3] KOPACZEWSKI. — *Zeit. f. physiol. Chemie*, t. LXXX, 1912, p. 182.
- [4] KOPACZEWSKI. — *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLVI, 1913, p. 1853.
- [5] KOPACZEROSKI. — *Comptes rendus Acad. des Sciences* 1913.

(1) Ce point de vue a été développé par nous dans un article spécial dans l'*Internationale Zeitschrift für physikalisch-chemische Biologie*, 1914.

- [6] KOPACZEWSKI. — *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, t. II, 1912, p. 850.
- [7] KOPACZEWSKI. — *Biochem. Zeit.*, t. XLIV, 1912, p. 349.
- [8] OSTWALD. — *Journ. f. prakt. Chemie*, t. XXIX, 1884, p. 385.
OSTWALD. — *Zeit. f. physik. Chem.*, t. III, 1889, p. 170 et suiv.
- [9] ABDERHALDEN. — *Handbuch d. bioch. Arbeitsmeth.*, t. III, p. 1339.
SÖRENSEN. — *Biochem. Zeit.*, t. XXIII, 1910.
- [10] MICHAELIS et RONA. — *Biochem. Zeit.*, t. LVII, 1913, p. 458.
- [11] G. BERTRAND et M^{lle} ROZENBAND. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIII, 1909, p. 314.
G. BERTRAND et M. et M^{me} ROSENBLATT. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, 1913, p. 321 et 932.

ERRATA

MÉMOIRE DE M. A. LAVERAN : *Les leishmanioses chez les animaux.*

Page 100, ligne 21, au lieu de : *parasites naturels des simulies*, lire : *parasites naturels des phlébotomes*.

Même page, lignes 30 et 31, au lieu de : *La fréquence de ces parasites chez les simulies et le fait que l'existence de ces mouches*, lire : *La fréquence de ces parasites chez les simulies et les phlébotomes et le fait que l'existence de ces insectes*.

Page 101, ligne 4, au lieu de : *qu'il pourrait exister une relation entre les Flagellés des simulies*, lire : *qu'il pourrait exister une relation entre les Flagellés des simulies ou des phlébotomes*.

Le Gérant : G. MASSON.



Fig. 1.



Fig. 2.

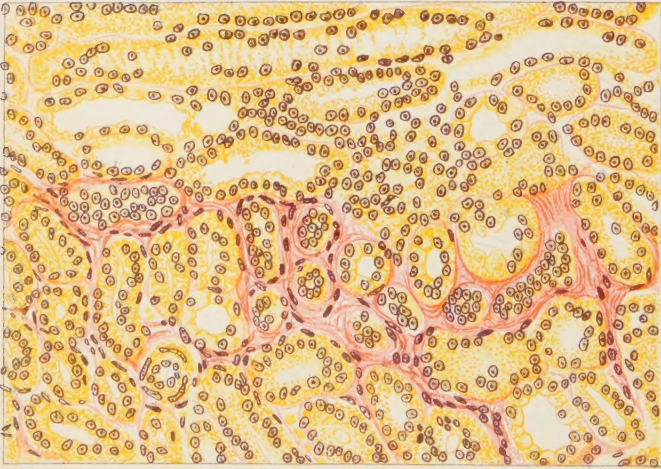


Fig. 5.





Fig. 3.



Fig. 4.

Fig. 7.

